

Impacto do uso sementes de milho tratadas com fungos micorrízicos e bactérias diazotróficas na comunidade fúngica do solo em consórcio Milho-Braquiária

Bianca Braz Mattos⁽¹⁾; Ivanildo Evódio Marriel⁽²⁾ Christiane Abreu de Oliveira⁽³⁾; Francisco Adriano de Souza⁽⁴⁾; Antonio Marcos Coelho⁽⁵⁾; Renata Estebanez Vollu⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Analista; Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo; Sete Lagoas, Minas Gerais; bianca.mattos@embrapa.br; ⁽³⁾ Pesquisadora; Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo; ^(2,4,5) Pesquisador; Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo; ⁽⁶⁾ Universidade Federal do Rio de Janeiro.

RESUMO: A integração de culturas de grãos com plantas forrageiras é uma técnica de cultivo sustentável que viabiliza a recuperação de solos degradados. Ainda no conceito de agricultura sustentável, a utilização de inoculantes tem se destacado como uma alternativa para a complementação da adubação convencional, reduzindo os custos e os impactos ambientais causados pelo uso de adubos químicos. O objetivo do trabalho foi avaliar o impacto dessas duas alternativas sustentáveis de cultivo na biodiversidade de fungos do solo. O DNA total das amostras de solo rizosférico de braquiária foi extraído e o produto de sua amplificação por PCR foi comparado pela técnica de DGGE (eletroforese em gel de gradiente). A partir da construção do dendograma e análise dos agrupamentos formados foi possível concluir que, entre as variáveis estudadas, a dose de fósforo (P) foi a mais impactante na diversidade microbiana. Em geral, as áreas de alto fósforo apresentaram uma maior diversidade quando comparadas às de baixo fósforo, demonstrando a sensibilidade de alguns gêneros fúngicos à ausência de P. Na região de baixo fósforo, o tratamento das sementes com o inoculante misto (micorriza+diazotróficas) teve um impacto positivo na diversidade fúngica, proporcionando o reagrupamento dessa comunidade com as de alto fósforo. Esse dado sugere que os microrganismos componentes do inoculante misto estabeleceram uma relação positiva, favorecendo o aumento da diversidade no solo e possível relação com o aumento do fósforo no solo. No entanto, estudos posteriores são necessários para a compreensão desta interação.

Termos de indexação: Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante; Integração Lavoura Pecuária; inoculantes consorciados.

INTRODUÇÃO

A cultura de milho é destaque no mercado mundial de produção de grãos (CiMILHO, 2013). No Brasil, o cultivo do milho é realizado em duas safras, sendo que a primeira ocorre na época tradicional de cultivo, durante o período chuvoso (safra) e a segunda safra refere-se ao milho de sequeiro plantado no inverno (safrinha). A safrinha vem ganhando destaque nos últimos anos, pois sua produção possibilita a produção de grãos para praticamente o ano inteiro (CiMILHO, 2013).

No entanto, o cultivo de milho na safrinha esbarra em alguns problemas relacionados ao sistema produtivo. Entre eles podemos citar: (1) baixa disponibilidade hídrica e irregularidade na precipitação pluvial no período outono/inverno (ZANINE et al., 2003); (2) emergência das plantas daninhas, em virtude da agressividade na formação dessas espécies forrageiras após a colheita da cultura produtora de grãos (FREITAS et al., 2005); e (3) a baixa produção de palhada, no período de outono/inverno e inverno/primavera.

Para contornar os problemas relacionados à safrinha, diversos agricultores têm optado pelo sistema de integração lavoura-pecuária (iLP) como alternativa ao sistema de plantio tradicional para a cultura de milho (ZANINE et al., 2003).

Dentro da proposta do sistema de iLP, o consórcio de culturas de grãos com plantas forrageiras viabiliza a recuperação de pastagens e solos degradados, incorporando áreas para a produção de milho, leite e carne. A recuperação das áreas degradadas por meio da iLP dá-se em razão da maior produção de palha proporcionada pelo consórcio. O acúmulo de palhada favorece a infiltração de água, permitindo maior exploração do perfil do solo pelas raízes e diminuindo o processo erosivo. Aliado a práticas conservacionistas, como plantio direto, o sistema é uma alternativa de

produção sustentável, com ganhos econômicos, sociais e ambientais (SEVERINO et al., 2006).

Entre as forrageiras plantadas em consórcio com o milho no Brasil, destaca-se a *Brachiaria brizantha* que por causa da sua alta relação C/N, possibilita a longevidade da cobertura do solo (PORTES et al., 2000; JAKELAITIS et al., 2004).

Ainda no conceito de agricultura sustentável, a utilização de inoculantes fosfatados e nitrogenados tem se destacado como uma alternativa para a complementação da adubação convencional. Atualmente sabe-se que as vantagens do uso de inoculantes vão além da fixação biológica de nitrogênio e da mineralização e solubilização de fosfatos. Características como inibição de patógenos, indução de resistência a doenças e a produção de fito-hormônios têm despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa, levando ao estudo dos inoculantes na promoção de crescimento em gramíneas.

A evolução das técnicas de biologia molecular proporcionou avanços significativos no estudo da ecologia microbiana no solo, permitindo o entendimento das interações estabelecidas entre plantas e microrganismos que antes eram subestimadas pelos métodos clássicos de cultivo e análises fisiológicas de microrganismos (COUTINHO et al., 1999; ZILLI et al., 2003).

Diante desse cenário, o objetivo do trabalho foi avaliar o impacto da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas na comunidade fúngica do solo em consórcio Milho-Braquiária.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento de campo foi instalado no município de Sete Lagoas, Minas Gerais, na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, na safra 2012/2013.

Delineamento, tratamentos e amostragem

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com três repetições, em esquema de parcela subdividida. Foram estudados três níveis de fósforo: (1) Médio (15 mg/dm³); (2) Alto (30 mg/dm³) e (3) Baixo (< 5 mg/dm³), nas parcelas, dois sistemas de cultivo: (1) monocultivo de milho e (2) milho + braquiária e, nas subparcelas, quatro tipos de tratamentos das sementes de milho: (1) inoculação com as bactérias diazotróficas (BFN); (2) inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMA); (3) BFN + FMA e (4) sementes sem inoculação.

O milho (híbrido Power Corn) foi semeado a uma profundidade de 5 cm, com 0,70 m de distância entre linhas e cinco sementes por metro.

Com base na análise do solo e na necessidade nutricional da cultura, foram aplicados 100 kg/ha de ureia somados a 100 kg/ha de cloreto de potássio e 100 kg/ha de gesso, para correção do solo.

A *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés foi semeada na linha e entre linha do milho no tratamento composto por milho consorciado.

As amostras de solo rizosférico da braquiária foram coletadas após florescimento do milho, peneiradas e utilizadas para análise da diversidade fúngica através da técnica de DGGE. Com a finalidade de reduzir o número de amostras de trabalho, as repetições foram agrupadas de forma a compor uma só amostra para cada tratamento.

Extração de DNA

O DNA total da comunidade microbiana foi extraído de cada amostra composta (0,5 g) usando o kit *FastDNA Spin Kit for Soil* (BIO 101 Systems, USA). A integridade do DNA extraído foi avaliada conforme descrito por Sambrook et al. (1989). A quantificação do DNA extraído foi realizada em aparelho NanoDrop (Thermo Scientific, EUA).

Amplificação do espaçador interno transcrito dos fungos (*ITS –internal transcribed spacer*) e posterior análise por DGGE

Para a amplificação da comunidade fúngica foi utilizado um protocolo de *nested* PCR. Na primeira reação, foram utilizados os iniciadores EF4 e ITS4 (Tabela 1). As condições para amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 34 ciclos a 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min e 30 seg seguidos por uma extensão final a 72 °C por 5 min (ANDERSON et al., 2003). O produto da primeira amplificação foi utilizado como molde na segunda reação de PCR.

Na segunda reação, foram utilizados os iniciadores ITS1F-GC e ITS2R (Tabela 1). As condições para amplificação foram: desnaturação inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 34 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C, 30 seg a 72 °C e uma extensão final de 5 min a 72 °C (ANDERSON et al., 2003).

As análises de DGGE foram realizadas como descrito por MUYZER e colaboradores (1993) usando o aparato "Dcode™ Universal Mutation Detection System" (BIO-Rad, Richmond, EUA). Os géis de poliacrilamida continham um gradiente desnaturante de ureia e formamida variando de 20 a 55%. A eletroforese foi realizada por 16 h a 100 V a 60 °C. Após a corrida, os géis foram corados por 1 h com *SYBER Green I* (Molecular Probes, The Netherlands) e imediatamente fotografados sob a luz U.V. Para a análise dos géis de DGGE foram construídos dendrogramas baseados na presença/ausência de bandas utilizando o método do UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) utilizando o coeficiente de Pearson através do software BioNumerics (Applied Maths, Ghent, Bélgica).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram a avaliação do impacto da inoculação das sementes na comunidade fúngica do solo em diferentes níveis de fósforo (Figura 1).

Avaliação do perfil genético de cada amostra, gerado pela presença ou ausência de microrganismos no DGGE, permitiu o agrupamento das comunidades microbianas em dois grupos principais (**Figura 2**). O primeiro grupo foi composto por amostras que apresentavam uma maior diversidade genética, representado majoritariamente

Reação	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Ref.
1ª reação	EF4	GGAAGGGRTGTA TTTATTAG	Anderson et al., 2003
	ITS4	TCCTCCGCTTATT GATATGC	Anderson et al., 2003
2ª reação	ITS1	CTTGGTCATTTAG AGGAAGTAA	Anderson et al., 2003
	ITS2	GCTGCGTTCTTCA TCGATGC	Anderson et al., 2003

por tratamentos plantados no bloco de alto fósforo. Essa maior diversidade, em regiões de alto fósforo, sugere que o fósforo é um nutriente restritivo para determinados gêneros ou espécies fúngicas no solo. Dentre as amostras do primeiro grupo, somente a correspondente a inoculação das sementes com os fungos micorrízicos arbusculares acrescidos de bactérias diazotróficas (**Linha cinco, Figura 2**) era representante do bloco de baixo fósforo. Esse dado sugere que, neste tratamento, em condições de baixo fósforo, a utilização de sementes tratadas com o inoculante misto pode ter proporcionado o desenvolvimento dos microrganismos que são sensíveis ao baixo nível de P, assemelhando-se, em nível de diversidade, às condições de alto fósforo. No entanto, as amostras de solo cultivadas com as sementes tratadas com os inoculantes BFN e FMA separadamente apresentaram diversidade semelhante à testemunha de baixo fósforo, sugerindo que o efeito isolado dos inoculantes na comunidade do solo foi menor do que o efeito consorciado. Esses dados sugerem que os microrganismos componentes do inoculante misto estabeleceram uma relação positiva favorecendo o objetivo final do tratamento das sementes que era o aumento de P no solo. No entanto, estudos posteriores são necessários para a compreensão desta interação.

Figuras e Tabelas

Tabela 1: Sequências dos iniciadores oligonucleotídios utilizados na reação de Nestead

PCR para amplificação da região ITS da comunidade fúngica

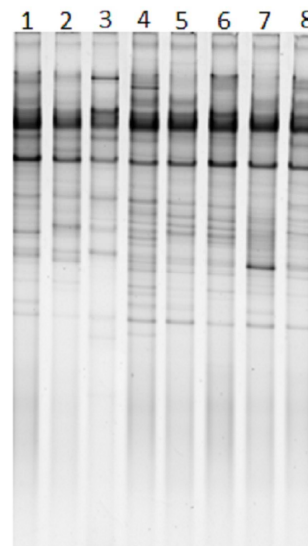


Figura 1: Perfil de bandas gerado pela técnica de DGGE (eletroforese em gel de gradiente) da comunidade fúngica em amostras de solo rizosférico de braquiária em cultivo consorciado com milho em dois níveis de P. (1) Testemunha em Baixo P; (2) BFN em Baixo P; (3) Micorriza em Baixo P; (4) BFN+Micorriza em Baixo P; (5) Testemunha em Alto P; (6) BFN em Alto P; (7) Micorriza em Alto P; (8) BFN+Micorriza em alto P.

CONCLUSÕES

Entre as variáveis estudadas, o nível de fósforo (P) foi o mais impactante na diversidade microbiana. Em geral, as áreas de alto fósforo apresentaram uma maior diversidade quando comparadas às de baixo fósforo, demonstrando a sensibilidade de alguns gêneros fúngicos à ausência de P. Na região de baixo fósforo, o tratamento das sementes com o inoculante misto (micorriza+diazotróficas) teve um impacto positivo na diversidade fúngica, proporcionando o agrupamento dessa comunidade juntamente com as de alto fósforo. No entanto, estudos posteriores são necessários para a compreensão desta interação.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Milho e Sorgo pela estrutura para a realização dos experimentos, ao CNPq e à Fapemig pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D.; PROSSER, J. I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland-Scots

pine (*Pinus sylvestris*) gradient. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, p. 1121-1132, 2003.

CiMILHO. Centro de Inteligência do Milho. Disponível em: <<http://cimilho.cnpms.embrapa.br/inicio/>>. Acesso em: 08 jan. 2013.

COUTINHO, H. L. da C.; OLIVEIRA, V. M. de; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 3, p. 491-503, 1999.

FREITAS, F. C. L.; FERREIRA, F. A.; FERREIRA, L. R.; SANTOS, M. V.; AGNES, E. L. Cultivo consorciado de milho para silagem com *Brachiaria brizantha* em sistema de plantio convencional. **Planta Daninha**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 635-644, 2005.

JAKELAITIS, A. **Técnicas para implantação do consórcio milho com *Brachiaria spp.*** 2004. 73 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MULDER, C.; WOUTERSE, M.; RAUBUCH, M.; ROELOFS, W.; RUTGERS, M. Can transgenic maize affect soil microbial communities? **PLoS Computational Biology**, v. 2, n. 9, p. 1165-1172, 2006. doi:10.1371/journal.pcbi.0020128.

PORTES, T. de A.; CARVALHO, S. I. C. de; OLIVEIRA, I. P. de; KLUTHCOUSKI, J. Análise do crescimento de uma cultivar de braquiária em cultivo solteiro e consorciado com cereais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 7, p.1349-1358, jul. 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANNIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SEVERINO, L. S.; FERREIRA, G. B.; MORAES, C. R. A.; GONDIM, T. M. S.; CARDOSO, G. D.; VIRIATO, J. R.; BELTRÃO, N. E. R. Produtividade e crescimento da mamoneira em resposta à adubação orgânica e mineral. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 879-882, 2006.

ZANINE, A. M.; SCHIMIDT, L. T.; DIAS, P. F.; SOUTO, S. M. Produção e qualidade do capim Tanzânia (*Panicum maximum*) em diferentes idades e adubado com doses de N de chorume bovino. **Pasturas Tropicais**, Cali, v. 25, n. 2, p. 30-36, 2003.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M.C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 20, p. 391-411, 2003.

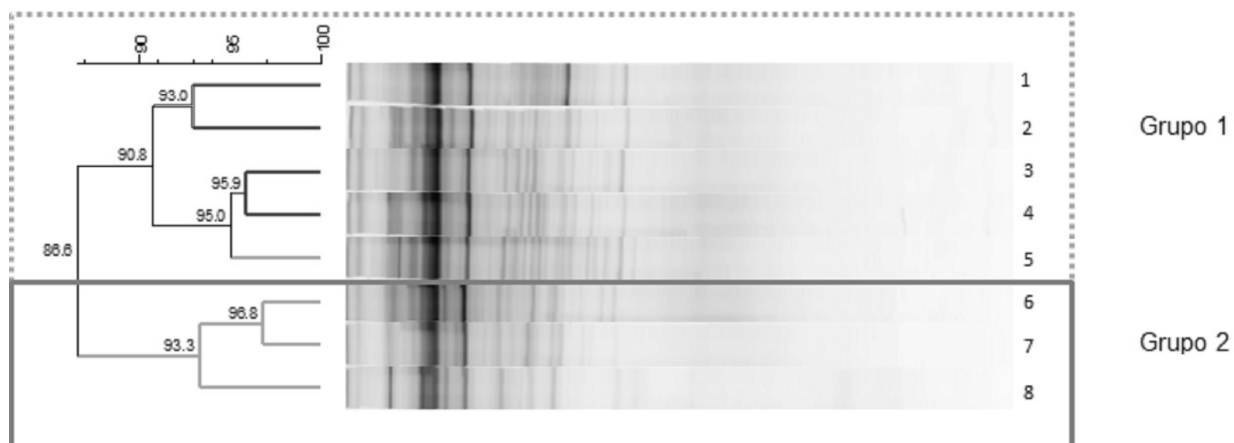


Figura 2: Avaliação da estrutura da comunidade de fúngica da rizosfera da braquiária mediante aos diferentes tratamentos de semente. (1) Micorriza em Alto P; (2) BFN+Micorriza em alto P; (3) Testemunha em Alto P; (4) BFN em Alto P; (5) BFN+Micorriza em Baixo P; (6) Testemunha em Baixo P; (7) BFN em Baixo P; (8) Micorriza em Baixo P.